

УДК 615.322.099:582.929.4-035.22

<https://doi.org/10.24959/cphj.19.1501>**К. В. Цеменко, І. В. Кіреєв, О. М. Кошовий, К. С. Толмачова, І. В. Боцула**

Національний фармацевтичний університет

Вивчення гострої токсичності у мишей після введення фітосубстанції глікозидів фенольних сполук з листя брусниці звичайної в комбінації з амінокислотою аргінін

На етапі первинного фармакологічного скринінгу визначення класу токсичності досліджуваних фітосубстанцій, які мають різний якісний та кількісний склад, що пропонуються як перспективні засоби для створення фармакологічних препаратів, є першим етапом доклінічних досліджень, метою яких є отримання результатів щодо небезпечності та можливої дії досліджуваної речовини на організм експериментальних тварин в умовах короткотривалої дії високих доз препарату.

Мета дослідження. Вивчення гострої токсичності у мишей після внутрішньошлункового введення сполуки-лідера.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження стала модифікована новогаленова фітосубстанція, отримана з листя брусниці звичайної, яка представляє собою комплекс глікозидів фенольних сполук у комбінації з амінокислотою аргінін. Визначення гострої токсичності проводилось згідно з методичними рекомендаціями «Доклінічні дослідження лікарських засобів» за редакцією Стефанова О. В. на безпородних мишах масою 20-26 г із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та в інших наукових цілях.

Результати. У ході експериментального дослідження вдалося з'ясувати, що досліджувану сполуку-лідера можна віднести до відносно нешкідливих речовин (VI клас за класифікацією К. К. Сидорова), так як при внутрішньошлунковому введенні дози 20000 мг/кг у тварин не виявлені ознаки інтоксикації та випадки летальності.

Висновки. Досліджено гостру токсичність сполуки-лідера при внутрішньошлунковому введенні дози 20000 мг/кг.

Ключові слова: сполука-лідера; фітосубстанція; брусниця звичайна; гостра токсичність

K. V. Tsemenko, I. V. Kireyev, O. M. Koshovyi, K. S. Tolmachova, I. V. Botsula

National University of Pharmacy

The study of the acute toxicity in mice after administration of a phytosubstance glycosides of phenolic compounds from *Vaccinium vitis-idaea* leaves in combination with arginine amino acid

At the stage of the primary pharmacological screening the determination of the toxicity class of the phytosubstances with different qualitative and quantitative composition proposed as promising products for creating pharmacological medicines is the first step of preclinical studies, which purpose is to obtain results on toxicity and possible negative effects of the substance studied on the body of experimental animals in short-term effects of high doses of the drug.

Aim. To study the acute toxicity of the lead-compound in mice after intragastric administration.

Materials and methods. The object of the study was a modified neogalenical phytosubstance obtained from *Vaccinium vitis-idaea* leaves. It is a complex of glycosides of phenolic compounds in combination with arginine amino acid. The acute toxicity was determined according to the methodological recommendations "Preclinical studies of medicinal products" edited by Stefanov O. V. on outbred mice weighing 20-26 g, adhering to the basic provisions of the Council of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Results. During the experimental study it was found that the lead-compound studied could be referred to relatively harmless substances (VI class according to Sydorov classification) as no signs of intoxication and lethality were detected when administering the intramuscular dose of 20000 mg/kg.

Conclusions. The acute toxicity of the lead-compound has been studied with intramuscular administration of the dose of 20000 mg/kg.

Key words: lead-compound; phytosubstance; *Vaccinium vitis-idaea*; acute toxicity

К. В. Цеменко, И. В. Киреев, О. Н. Кошевой, К. С. Толмачева, И. В. Боцула

Национальный фармацевтический университет

Изучение острой токсичности у мышей после введения фитосубстанции гликозидов фенольных соединений из листьев брусники обыкновенной в комбинации с аминокислотой аргинин

На этапе первичного фармакологического скрининга определение класса токсичности исследуемых фитосубстанций, которые имеют разный качественный и количественный состав, предлагаемых как перспективные средства для создания фармакологических препаратов, является первым этапом доклинических исследований, целью которого является получение сведений о токсичности и возможном негативном воздействии исследу-

емого вещества на организм экспериментальных животных в условиях кратковременного действия высоких доз препарата.

Цель исследования. Изучение острой токсичности у мышей после внутрижелудочного введения соединения-лидера.

Материалы и методы. Объектом исследования стала модифицированная новогаленовая фитосубстанция, полученная из листьев брусники обыкновенной, которая представляет собой комплекс гликозидов фенольных соединений в сочетании с аминокислотой аргинин. Определение острой токсичности проводилось в соответствии с методическими рекомендациями «Доклинические исследования лекарственных средств» под редакцией Стефанова А. В. на беспородных мышах массой 20-26 г с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях.

Результаты. В ходе экспериментального исследования удалось выяснить, что исследуемое соединение-лидер можно отнести к относительно безопасным веществам (VI класс по классификации К. К. Сидорова), так как при внутрижелудочном введении дозы 20000 мг/кг у животных не выявлены признаки интоксикации и случаи летальности.

Выводы. Изучена острая токсичность соединения-лидера при внутрижелудочном введении дозы 20000 мг/кг.

Ключевые слова: соединение-лидер; фитосубстанция; брусника обыкновенная; острая токсичность

На теперішній час створення нових лікарських засобів рослинного походження є однією з актуальніших проблем фармацевтичної науки [1, 2]. Тому на етапі первинного фармакологічного скринінгу визначення класу токсичності досліджуваних фітосубстанцій, які мають різний якісний та кількісний склад, що пропонуються як перспективні засоби для створення фармакологічних препаратів, є першим етапом доклінічних досліджень, метою яких є отримання результатів щодо небезпечності та можливої дії досліджуваної речовини на організм експериментальних тварин в умовах короткотривалої дії високих доз препарату [3]. На кафедрі фармакогнозії НФаУ під керівництвом професора Кошового О. М. були одержані нові модифіковані галенові та новогаленові фітосубстанції з листя брусниці звичайної [4]. Згідно з попередніми дослідженнями нами було виділено сполуку-лідера, яка представляє собою комплекс глікозидів фенольних сполук з листя брусниці звичайної в комбінації з амінокислотою аргінін, яка володіє вираженням антибактеріальним та діуретичним ефектом [4, 5].

Метою роботи стало вивчення гострої токсичності у мишей після внутрішньошлункового введення сполуки-лідера.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження стала модифікована новогаленова фітосубстанція, отримана з листя брусниці звичайної, яка представляє собою комплекс глікозидів фенольних сполук у комбінації з амінокислотою аргінін. Визначення гострої токсичності проводилось згідно з методичними рекомендаціями «Доклінічні дослідження лікарських засобів» за редакцією Стефанова О. В. на беспородних мишах масою 20-26 г із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та в інших наукових цілях [6, 7].

Першочергово лабораторних тварин розділили на 4 групи, кожна з яких включала 6 тварин:

1 група: в/ш введення самцям сполуки-лідера;
2 група: в/ш введення самицям сполуки-лідера;
3 група-контроль: в/ш введення самцям води дистильованої;
4 група-контроль: в/ш введення самицям води дистильованої.

Згідно з літературними даними брусниця звичайна відноситься до нетоксичних лікарських рослин, тому ми не випадково обрали дозу 20000 мг/кг, яка є максимальною дозою VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини), яка представляє собою лімітуючий показник у ході визначення LD_{50} для внутрішньошлункового введення. Після введення досліджуваної дози препарату за мишами спостерігали впродовж 14 днів та регулярно фіксували і оцінювали їх загальний стан, координацію рухів, тонус скелетної мускулатури, реакцію на тактильні, больові, звукові подразники, частоту та глибину дихальних рухів, стан шерсті та шкірного покриву, споживання корму та води, летальність, динаміку маси тіла (на 3, 7 та 14 добу), а після закінчення та виведення тварин з експерименту шляхом евтаназії під ефірним наркозом ретельно проводили макроскопічний огляд внутрішніх органів та визначали їх масу, що дало змогу розрахувати інтегральний показник – масовий коефіцієнт внутрішніх органів. Обробку експериментальних даних проводили за допомогою методів математичної статистики з використанням прикладних комп'ютерних програм STATISTIKA 6.0 та MS EXCEL 7.0

Результати та їх обговорення

Отримані результати вивчення гострої токсичності досліджуваної фітосубстанції представлені в табл. 1.

У перші години після введення досліджуваної сполуки-лідера виражених явищ інтоксикації лабораторних тварин зареєстровано не було. Загальний стан та поведінка мишей відповідали фізіологічній нормі та не відрізнялись від тварин контрольної групи: тварини вільно переміщались по клітці, нормально реагували на

Таблиця 1

Показники летальності мишей при вивченні гострої токсичності сполуки-лідера після її одноразового внутрішньошлункового (в/ш) введення

Умови досліджу	Стать	Доза речовин, мг/кг	Кількість загинув тварин/ кількість тварин у групі
1 група: в/ш введення самцям фітосуб-станції сполуки-лідера	♂	20000	0/6
2 група: в/ш введення самицям фітосуб-станції сполуки-лідера	♀	20000	0/6
3 група-контроль: в/ш введення самцям води дистильованої	♂	20000	0/6
4 група-контроль: в/ш введення самицям води дистильованої	♀	20000	0/6

світлові та звукові подразники, залишались у нормі координація та активність рухів, до того ж, порушення дихання або судом не спостерігалось, акти дефекації та сечовиділення залишались у нормі. Наступного дня і впродовж ще 14 днів тварини, як і на початку експерименту, мали охайний зовнішній вигляд, були активними, кількість споживання води та їжі у дослідних групах не відрізнялась від групи контролю, процеси сечовиділення і дефекації були в нормі.

З метою оцінки токсичної дії сполуки-лідера на організм тварин досліджували зміни маси тіла. Визначили, що динаміка маси тіла мишей обох статей, які одержували досліджуваний засіб, перебувала в межах фізіологічної норми та не відрізнялась за показниками від контрольних груп експериментальних тварин (табл. 2).

Отже, при аналізі маси тіла тварин відмічена відсутність впливу сполуки-лідера на даний показник. Впродовж усіх 14 днів спостереження у тварин ознак занепокоєння, пригнічення локомоції та симптомів інтоксикації не спостерігалось взагалі.

При вивченні токсикологічних характеристик сполуки-лідера після евтаназії мишей шляхом дислокації шийних хребців під ефірним нар-

козом на 14 день дослідження провели патоморфологічне дослідження органів черевної і грудної порожнини, сечової системи. При макроскопічному вивченні органів лабораторних тварин встановлено, що сполука-лідер не спричиняє видимих відхилень від фізіологічної норми.

Усі органи мають правильне анатомічне розташування, звичайний колір і консистенцію. У паренхіматозних органах не виявлено ознак запалення, порушень кровообігу і трофіки. Поверхня печінки і нирок гладка, колір та форма звичайні. Слизова оболонка шлунка, а також кишечника на момент огляду звичайного кольору з властивою рельєфністю без ознак набряків, ерозій і запалення. Відносна маса внутрішніх органів мишей, яким вводили досліджуваний препарат і воду, статистично не відрізнялась за показниками у групах (табл. 3). Отже, одноразове внутрішньошлункове введення (в дозі 20000 мг/кг) досліджуваної сполуки-лідера не призводить до загибелі мишей обох статей, не впливає на приріст маси тіла, інтегративні показники функціонального стану лабораторних тварин, а також відносну масу внутрішніх органів, що свідчить про відсутність значущої токсичної дії цього лікарського засобу. Результати досліджень вказу-

Таблиця 2

Динаміка маси тіла мишей обох статей при одноразовому внутрішньошлунковому введенні комплексу глікозидів фенольних сполук з листя брусниці звичайної в комбінації з аргініном ($M \pm m$; $n = 24$)

Група	Вихідні дані, г	3 дні, г	7 днів, г	14 днів, г
Самці				
Контрольна група	20±0,02	20,10±0,03	20,44±0,18	20,71±0,39
Сполука-лідер	19,20±0,59*	19,31±0,57*	19,48±0,60*	19,82±0,69*
Самиці				
Контрольна група	19,97±0,10	20,11±0,04	20,25±0,09	20,45±0,08
Сполука-лідер	20,64±0,48*	20,77±0,54*	20,99±0,60*	21,23±0,63*

Примітка. * – відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$.

Таблиця 3

Масові коефіцієнти внутрішніх органів мишей ($M \pm m$) після однократного в/ш введення новогаленового комплексу глікозидів фенольних сполук в комплексі з аргініном

Група	Орган					
	серце	нирка (права)	нирка (ліва)	селезінка	печінка	легені
1 група: в/ш введення води дистильованої	0,38±0,0007	0,67±0,0009	0,65±0,0019	1,24±0,0019	6,97±0,010	1,16±0,0074
2 група: в/ш введення сполуки-лідера самицям	0,47±0,0005	0,73±0,0010	0,73±0,0010	1,01±0,0021	7,79±0,0065	0,85±0,0012
3 група-контроль: в/ш введення води дистильованої	0,37±0,0009	0,47±0,0006	0,48±0,0005	0,71±0,0007	6,85±0,0057	0,62±0,0002
4 група-контроль: в/ш введення сполуки-лідера самцям	0,55±0,0001	0,59±0,0002	0,58±0,0002	0,54±0,0008	6,48±0,0026	0,72±0,0011

ють на те, що LD_{50} для досліджуваної фітосубстанції при внутрішньошлунковому введенні мишам перебуває за межами 15000 мг/кг.

Аналіз масових коефіцієнтів внутрішніх органів мишей самців та самиць після одноразового введення комплексу глікозидів фенольних сполук у комбінації з аргініном свідчить про відсутність патологічних змін в організмі експериментальних тварин у порівнянні з контрольними (табл. 3).

Розраховували масові коефіцієнти за формулою:

$$MK = m \text{ органу} / M \text{ тварини} \cdot 100 \%$$

Вищесказане свідчить про те, що встановлення середньолетальної дози (LD_{50}) сполуки-лідера неможливе, так як введення дози 20000 мг/кг привело до нульової летальності. Отже, можна

стверджувати, що сполука-лідер за токсикологічною класифікацією Сидорова К. К. відноситься до VI класу токсичності і є малотоксичною речовиною.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено гостру токсичність сполуки-лідера при внутрішньошлунковому введенні дози 20000 мг/кг.

2. Встановлено клас токсичності сполуки-лідера. Згідно з токсикологічною класифікацією К. К. Сидорова дана фітосубстанція належить до VI класу токсичності і є малотоксичною речовиною.

3. Аналіз внутрішніх органів продемонстрував, що усі показники знаходились в межах фізіологічної норми, що дає змогу вважати, що досліджувана сполука-лідер не чинить негативно впливу на внутрішні органи.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

1. Малкоч, А. В. Фитопрепараты в лечении и профилактике инфекции органов мочевой системы / А. В. Малкоч, Н. Н. Филатова, Н. Н. Хасабов // Лечащий врач. – 2016. – № 9. – С. 7.
2. Эрман, М. В. Фитотерапия в лечении инфекции мочевой системы у детей / М. В. Эрман // Эффективная фармакотерапия. Педиатрия. – 2014. – № 2.
3. Yusukey, N. Фармакогеномика и токсичность лекарственных препаратов / Nakamura Yusukey // Провізор. – 2008. – № 2.
4. Патент України на корисну модель № 133723, UA, МПК (2006), A61K 31/05 (2006.01), A61K 127/00, A61P 13/00. Спосіб одержання лікарського засобу з діуретичною дією з листя брусниці звичайної / К. В. Цеменко, О. М. Кошовий, І. В. Кіреєв, М. А. Комісаренко.
5. Tsemenko, K. V. Antibacterial activity of phytosubstances from Vaccinium Vitis-idaea leaves / K. V. Tsemenko // Annals of Mechnikov Institute. – 2018. – № 3. – P. 23–26. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1456526>
6. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. – 1986. – С. 137. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / за ред. Стефанова О. В. – К. : Авіценна, 2001. – 528 с.

References

1. Malkoch, A. V., Filatova, N. N., Khasabov, N. N. (2016). *Lechashchii vrach*, 9, 7.
2. Erman, M. V. (2014). *Effektivnaia farmakoterapiia. Pediatriia*, 2.
3. Yusukey, N. (2008). *Provizor*, 2.

4. Tsemenko, K. V., Koshovyi, O. M., Kireiev, I. V., Komisarenko, M. A. (2006). *Patent Ukrainy na korysnu model № 133723, UA, MPK (2006), A61K 31/05 (2006.01), A61K 127/00, A61P 13/00*.
5. Tsemenko, K. V. (2018). Antibacterial activity of phytosubstances from *Vaccinium vitis-idaea* leaves. *Annals of Mechnikov Institute*, 3, 23–26. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1456526>
6. *Yevropeiska konventsia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuiutsia dlia doslidnykh ta inshykh naukovykh tsilei*. (1986). 137. Available at: http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137
7. Stefanov, O. V. (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv (metodychni rekomendatsii)*. Kyiv: Avitsenna, 528.

Відомості про авторів / Information about authors / Сведения об авторах

Цеменко К. В., асистент кафедри фармакоterapiї, Національний фармацевтичний університет. E-mail: k-cemenko@ukr.net
Tsemenko K. V., teaching assistant of the Department of Pharmacotherapy, National University of Pharmacy. E-mail: k-cemenko@ukr.net
Цеменко К. В., ассистент кафедры фармакоterapiи, Национальный фармацевтический университет. E-mail: k-cemenko@ukr.net
Кіреєв І. В., доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакоterapiї, Національний фармацевтичний університет. E-mail: ivkireev@ukr.net

Kireyev I. V., Doctor of Medicine (Dr. habil), professor, head of the Department of Pharmacotherapy, National University of Pharmacy. E-mail: ivkireev@ukr.net

Киреев И. В., доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакоterapiи, Национальный фармацевтический университет. E-mail: ivkireev@ukr.net

Кошовий О. М., доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри фармакогнозії, Національний фармацевтичний університет. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com

Koshoviy O. M., Doctor of Pharmacy (Dr. habil), Professor, head of the Department of Pharmacognosy, National University of Pharmacy. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com

Кошевой О. Н., доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com

Толмачова К. С., аспірант кафедри фармакоterapiї, Національний фармацевтичний університет. E-mail: tolmacheva.karina.91@gmail.com

Tolmachova K. S., postgraduate student of the Department of Pharmacotherapy, National University of Pharmacy. E-mail: tolmacheva.karina.91@gmail.com

Толмачева К. С., аспірант кафедры фармакоterapiи, Национальный фармацевтический университет. E-mail: tolmacheva.karina.91@gmail.com

Ботула І. В., аспірант кафедри фармакоterapiї, Національний фармацевтичний університет. E-mail: botsula.iv@gmail.com

Botsula I. V., postgraduate student of the Department of Pharmacotherapy, National University of Pharmacy. E-mail: botsula.iv@gmail.com

Ботула И. В., аспірант кафедры фармакоterapiи, Национальный фармацевтический университет. E-mail: botsula.iv@gmail.com

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Дарвіна, 8/10, кафедра фармакоterapiї НФаУ. Тел. +380962405798.

E-mail: k-cemenko@ukr.net

Mailing address: 8/10, Darwin str., Kharkiv, 61002, Ukraine, National University of Pharmacy, Department of Pharmacotherapy.

+380962405798. E-mail: k-cemenko@ukr.net

Адрес для переписки: 61002, г. Харьков, ул. Дарвина, 8/10, кафедра фармакоterapiи НФаУ. Тел. +380962405798.

E-mail: k-cemenko@ukr.net

Надійшла до редакції 15.07.2019 р.